



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類7 A61K 38/19, 38/22, 38/29, 38/00, 47/16, 47/26, 47/14</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO00/51629</p> <p>(43) 国際公開日 2000年9月8日(08.09.00)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP00/01160</p> <p>(22) 国際出願日 2000年2月29日(29.02.00)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平11/52314 1999年3月1日(01.03.99) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA)[JP/JP] 〒115-8543 東京都北区浮間5丁目5番1号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてののみ) 佐藤 泰(SATO, Yasushi)[JP/JP] 〒171-8545 東京都豊島区高田3丁目41番8号 中外製薬株式会社内 Tokyo, (JP)</p> <p>(74) 代理人 社本一夫, 外(SHAMOTO, Ichio et al.) 〒100-0004 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所 Tokyo, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: PREPARATIONS STABILIZED OVER LONG TIME</p> <p>(54)発明の名称 長期安定化製剤</p> <p>(57) Abstract Stable G-CSF preparations showing a residual G-CSF ratio of 90 % or more after a long-term storage test at 25 °C for 3 months; showing a residual G-CSF ratio of 90 % or more after a long-term storage test at 40 °C for 2 months; showing a residual G-CSF ratio of 90 % or more after an accelerated test at 50 °C for 1 month; or showing a residual G-CSF ratio of 90 % or more after an accelerated test at 60 °C for 2 weeks; and showing a ratio of the formation of the methionine residue-oxidized derivative of G-CSF of 1 % or less after an accelerated test at 50 °C for 1 month or after an accelerated test at 60 °C for 2 weeks. A method for inhibiting the formation of the methionine residue-oxidized derivative of a physiologically active protein having methionine residues characterized by adding methionine to a composition containing this protein.</p>		

(57)要約

25℃-3ヶ月長期保存試験後におけるG-C-S-F残存率が90%以上であるか、40℃-2ヶ月長期保存試験後におけるG-C-S-F残存率が90%以上であるか、50℃-1ヶ月間の加速試験後におけるG-C-S-F残存率が90%以上であるか、60℃-2週間の加速試験後におけるG-C-S-F残存率が90%以上であり、かつ50℃-1ヶ月間の加速試験後又は60℃-2週間の加速試験後におけるG-C-S-Fのメチオニン残基酸化体生成率が1%以下である、安定なG-C-S-F製剤。メチオニンを、メチオニン残基を有する生理活性タンパク質含有組成物に添加することを特徴とする、該タンパク質のメチオニン残基酸化体生成の抑制方法も開示される。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AG	アンティグア・バーブーダ	DZ	アルジェリア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AL	アルバニア	EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AU	オーストラリア	FR	フランス	LS	レソト	SK	スロヴァキア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GE	グルジア	MA	モロッコ	TD	チャード
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BY	ベラルーシ	GW	ギニア・ビサウ		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
CA	カナダ	HR	クロアチア	ML	マリ	TZ	タンザニア
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CH	スイス	IE	アイルランド	MW	マラウイ	US	米国
CI	コートジボアール	IL	イスラエル	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CM	カメルーン	IN	インド	MZ	モザンビーク	VN	ヴェトナム
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラヴィア
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ	ZA	南アフリカ共和国
CU	キューバ	JP	日本	NO	ノルウェー	ZW	ジンバブエ
CY	キプロス	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド		
CZ	チェコ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	KR	韓国	RO	ルーマニア		

明細書

長期安定化製剤

技術分野

- 5 本発明はG-C S F（顆粒球コロニー刺激因子）製剤に関し、特に長期保存した後も活性成分の損失が少なく、かつG-C S Fのメチオニン残基の酸化体生成率の低い、安定化させたG-C S F製剤に関する。

背景技術

- 10 G-C S Fは、好中球の前駆細胞に作用し、その増殖ならびに分化成熟を促進する分子量約2万の糖タンパク質である。

- 本出願人によって、口腔底癌患者の腫瘍細胞から採取した細胞株を培養することにより高純度のヒトG-C S Fが精製されて以来、これを契機に、ヒトG-C S F遺伝子のクローニングに成功し、現在では遺伝子工学的方法によって微生物や動物細胞で組換えヒトG-C S Fを大量に生産することが可能になった。また、
15 本願出願人はこの精製したG-C S Fの製剤化に成功し、これを感染防御剤として市場に製品を供給している（特許第2116515号）。

- G-C S Fは極めて微量で使用され、通常成人一人当たり、0.1～1000 μ g（好ましくは5～500 μ g）のG-C S Fを含有する製剤を1～7回/週の割合で投与する。しかしながら、このG-C S Fは例えば注射用アンプル、注射器等の器壁に対し吸着性を示す。また、G-C S Fは不安定で、外的因子の影響を受けやすく、温度、湿度、酸素、紫外線等に起因して会合、重合あるいは酸化等の物理的、化学的变化を生じ、結果として大きな活性の低下を招く。
20

- そこで安定なG-C S F製剤を市場に供給するために種々の処方設計がなされている。例えば、（a）トレオニン、トリプトファン、リジン、ヒドロキシリジン、ヒスチジン、アルギニン、システイン、シスチン、メチオニンから選ばれる
25 少なくとも1種のアミノ酸；（b）少なくとも1種の含硫還元剤；又は（c）少なくとも1種の酸化防止剤；からなる群から選ばれる少なくとも1種を含む製剤（特許第2577744号）等が提案されている。また、安定化剤としてポリソルベートなどの界面活性剤を含むG-C S F製剤がある（特開昭63-1468

26号)。

また、容器への付着を少なくし、化学的変化を押さえるという観点からは、凍結乾燥製剤とすることが有利であり、マルトース、ラフィノース、スクロース、トレハロース又はアミノ糖を含有したG-C-S-F凍結乾燥製剤も報告されている

5 (特表平8-504784号)。

現在市場に供給されている製品には、これら化学的、物理的変化を抑制するために、安定化剤として一般的に使用されているヒト血清アルブミンあるいは精製ゼラチンなどのタンパク質が添加されているものがある。しかしながら、タンパク質を安定化剤として添加することに関しては、ウィルスのコンタミを除去する等のために非常に煩雑な工程を必要とする等の問題があった。

しかしながら、このようなタンパク質を添加しない場合には、G-C-S-Fのメチオニン残基の酸化体の生成が多くなり、品質劣化をもたらすという問題があった。

発明の開示

15 本発明の目的は、長期の保存にもより安定で、かつG-C-S-Fのメチオニン残基の酸化体生成率の低いG-C-S-F製剤を提供することである。

上記目的を達成するために鋭意研究した結果、本発明者らは安定化剤として特定アミノ酸を組み合わせることで、長期保存後もG-C-S-F残存率が高く、かつG-C-S-Fのメチオニン残基の酸化体生成率の低いG-C-S-F製剤となしうることを見だし本発明を完成した。

すなわち、本発明は、25℃-3ヶ月長期保存試験後におけるG-C-S-F残存率が90%以上であるか、40℃-2ヶ月長期保存試験後におけるG-C-S-F残存率が90%以上であるか、50℃-1ヶ月間の加速試験後におけるG-C-S-F残存率が90%以上であるか、60℃-2週間の加速試験後におけるG-C-S-F残存率が90%以上であり、かつ50℃-1ヶ月間の加速試験後又は60℃-2週間の加速試験後におけるG-C-S-Fのメチオニン残基酸化体生成率が1%以下である、安定なG-C-S-F製剤を提供する。

本発明はさらに、リジン、ヒスチジン、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、トレオニン、アスパラギンから成る群より選ばれる一種以上のアミノ酸

と、疎水性アミノ酸から選ばれる一種以上のアミノ酸、及びメチオニンを含む前記のG-C-S-F製剤を提供する。

本発明はさらに、疎水性アミノ酸がフェニルアラニン、トリプトファン及びロイシンから選択される前記のG-C-S-F製剤を提供する。

- 5 本発明はさらに、リジン、ヒスチジン、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸から成る群より選ばれる一種以上のアミノ酸と、フェニルアラニン、トリプトファン及びロイシンから成る群より選ばれる一種以上のアミノ酸、及びメチオニンを含む前記のG-C-S-F製剤を提供する。

- 10 本発明はさらに、フェニルアラニン、アルギニン及びメチオニンを含む前記のG-C-S-F製剤を提供する。

本発明はさらに、安定化剤として、実質的にタンパク質を含まない前記のG-C-S-F製剤を提供する。

本発明はさらに、凍結乾燥製剤である前記のG-C-S-F製剤を提供する。

本発明はさらに、マンニトールをさらに含む前記のG-C-S-F製剤を提供する。

- 15 本発明はさらに、界面活性剤をさらに含む前記のG-C-S-F製剤を提供する。

本発明はさらに、界面活性剤がポリオキシエチレンソルビタンアルキルエステルである前記のG-C-S-F製剤を提供する。

本発明はさらに、界面活性剤がポリソルベート20及び／又は80である前記のG-C-S-F製剤を提供する。

- 20 本発明はさらに、pHが5～7である前記のG-C-S-F製剤を提供する。

本発明はさらに、pHが5.5～6.8である前記のG-C-S-F製剤を提供する。

本発明はさらに、pHが6.5である前記のG-C-S-F製剤を提供する。

- 25 本発明はさらに、G-C-S-FがCHO細胞から産生されたG-C-S-Fである前記のG-C-S-F製剤を提供する。

本発明はさらに、リジン、ヒスチジン、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、トレオニン、アスパラギンから成る群より選ばれる一種以上のアミノ酸と、疎水性アミノ酸から選ばれる一種以上のアミノ酸を含み、pHが5～7であることを特徴とする、25℃-3ヶ月長期保存試験後におけるG-C-S-F残存率

が90%以上であるか、40℃-2ヶ月長期保存試験後におけるG-CSF残存率が90%以上であるか、50℃-1ヶ月間の加速試験後におけるG-CSF残存率が90%以上であるか、60℃-2週間の加速試験後におけるG-CSF残存率が90%以上である、安定なG-CSF製剤を提供する。

- 5 本発明はさらに、リジン、ヒスチジン、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸から成る群より選ばれる一種以上のアミノ酸と、フェニルアラニン、トリプトファン及びロイシンから成る群より選ばれる一種以上のアミノ酸を含み、pHが5~7であることを特徴とする、25℃-3ヶ月長期保存試験後におけるG-CSF残存率が90%以上であるか、40℃-2ヶ月長期保存試験後におけるG-CSF残存率が90%以上であるか、50℃-1ヶ月間の加速試験後におけるG-CSF残存率が90%以上であるか、60℃-2週間の加速試験後におけるG-CSF残存率が90%以上である、安定なG-CSF製剤を提供する。

本発明はさらに、pHが6.5である前記いずれかのG-CSF製剤を提供する。

- 15 本発明はさらに、メチオニンを、メチオニン残基を有する生理活性タンパク質含有組成物に添加することを特徴とする、該タンパク質のメチオニン残基酸化体生成の抑制方法を提供する。

本発明はさらに、生理活性タンパク質が、サイトカインまたは生理活性ペプチドである前記の方法を提供する。

- 20 本発明はさらに、生理活性タンパク質が、コロニー刺激因子またはPTHである前記の方法を提供する。

本発明はさらに、生理活性タンパク質が、G-CSF、エリスロポエチンまたはPTHである前記の方法を提供する。

- 25 本発明はさらに、安定化剤として他のタンパク質を含まないことを特徴とする前記の方法を提供する。

本発明はさらに、メチオニン残基を有する生理活性タンパク質含有組成物が、凍結乾燥されているかまたは溶液状態であることを特徴とする前記の方法を提供する。

本発明はさらに、メチオニンと他の一種以上のアミノ酸を含む、メチオニン残

基を有する生理活性タンパク質含有安定化組成物を提供する。

- 本発明はさらに、アミノ酸が、リジン、ヒスチジン、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、フェニルアラニン、トリプトファン、ロイシン、イソロイシン、バリン、アラニン、プロリン、グリシン、セリン、トレオニン、アスパラギン、グルタミン及びチロシンから成る群より選ばれる1種または2種以上である、前記メチオニン残基を有する生理活性タンパク質含有安定化組成物を提供する。

本発明はさらに、安定化剤として他のタンパク質を含まないことを特徴とする前記メチオニン残基を有する生理活性タンパク質含有安定化組成物を提供する。

10 図面の簡単な説明

図1は、試料34及び36を、60℃-2週間加速試験を行った後に、後述する方法2に記載する方法で実施したクロマトグラムを示す。

図2は、試料34~36を、調製直後及び50℃-1ヶ月加速試験を行った後に後述する方法2で実施したクロマトグラムを示す。

- 15 図3は、パラサイドホルモン溶液製剤を、実施例6で示す方法（50℃-3日間保存）で実施した、メチオニンの添加によるメチオニン残基酸化抑制作用を示したHPLCクロマトグラムである。なお、図3中、中央の最も大きいピークがPTH未変化体であり、Met-8ピーク、Met-18ピークがそれぞれ、8番目のメチオニン残基が酸化されたPTH、18番目のメチオニン残基が酸化されたPTHである。

20 発明を実施するための最良の形態

- 本発明の製剤に使用するG-CSFは高純度に精製されたヒトG-CSFであれば全て使用できる。具体的には、哺乳動物、特にヒトのG-CSFと実質的に同じ生物学的活性を有するものであり、天然由来のもの、および遺伝子組換え法によって得られたものを含む。遺伝子組換え法によって得られるG-CSFには天然のG-CSFとアミノ酸配列が同じであるもの、あるいは該アミノ酸配列の1または複数を欠失、置換、付加したもので前記生物学的活性を有するものを含む。本発明におけるG-CSFは、いかなる方法で製造されたものでもよく、ヒト腫瘍細胞の細胞株を培養し、これから種々の方法で抽出し分離精製したもの、

あるいは遺伝子工学的手法により大腸菌などの細菌類；イースト菌；チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、C 1 2 7細胞などの動物由来の培養細胞などに産生せしめ、種々の方法で抽出し分離精製したものが用いられる。好ましくは大腸菌、イースト菌又はCHO細胞によって遺伝子組換え法を用いて生産された
5 ものである。最も好ましくはCHO細胞によって遺伝子組換え法を用いて生産されたものである。

本発明のG-C S F製剤には好ましくは安定化剤としてヒト血清アルブミンや精製ゼラチンなどのタンパク質を実質的に含まない。

本発明のG-C S F製剤は、25℃-3ヶ月長期保存試験後におけるG-C S
10 F残存率が90%以上、好ましくは95%以上であるか、40℃-2ヶ月長期保存試験後におけるG-C S F残存率が90%以上、好ましくは95%以上であるか、50℃-1ヶ月間の加速試験後におけるG-C S F残存率が90%以上、好ましくは95%以上であるか、60℃-2週間の加速試験後におけるG-C S F残存率が90%以上、好ましくは95%以上であり、かつ50℃-1ヶ月間の加
15 速試験後又は60℃-2週間の加速試験後におけるG-C S Fのメチオニン残基酸化体生成率が1%以下、好ましくは検出限界以下であり、従来知られているG-C S F製剤に比べて極めて安定な製剤である。

本発明のG-C S F製剤の一例は、リジン、ヒスチジン、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、トレオニン、アスパラギンから成る群より選ばれる一
20 種以上のアミノ酸、好ましくはリジン、ヒスチジン、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸から成る群より選ばれる一種以上のアミノ酸と、疎水性アミノ酸から選ばれる一種以上のアミノ酸、好ましくはフェニルアラニン、トリプトファン及びロイシンから成る群より選ばれる一種以上のアミノ酸、及びメチオニンを含むG-C S F製剤である。

25 さらに、本発明のG-C S F製剤の一例としては、リジン、ヒスチジン、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、トレオニン、アスパラギンから成る群より選ばれる一種以上のアミノ酸、好ましくはリジン、ヒスチジン、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸から成る群より選ばれる一種以上のアミノ酸と、疎水性アミノ酸から選ばれる一種以上のアミノ酸、好ましくはフェニルアラニン、

トリプトファン及びロイシンから成る群より選ばれる一種以上のアミノ酸、及びメチオニンを含み、pHが5～7であることを特徴とする、25℃-3ヶ月長期保存試験後におけるG-C-S-F残存率が90%以上であるか、40℃-2ヶ月長期保存試験後におけるG-C-S-F残存率が90%以上であるか、50℃-1ヶ月間の加速試験後におけるG-C-S-F残存率が90%以上であるか、60℃-2週間の加速試験後におけるG-C-S-F残存率が90%以上であり、かつ50℃-1ヶ月間の加速試験後又は60℃-2週間の加速試験後におけるG-C-S-Fのメチオニン残基酸化体生成率が1%以下である、安定なG-C-S-F製剤である。

本発明で用いるアミノ酸は、遊離のアミノ酸ならびにそのナトリウム塩、カリウム塩、塩酸塩などの塩を含む。本発明の製剤には、これらのアミノ酸のD-、L-およびDL-体を含み、より好ましいのはL-体ならびにその塩である。

本発明の製剤に添加するアミノ酸の添加量は使用するアミノ酸の種類により、後述する試験方法を用いて好ましい範囲を定めることができる。一般には最終投与量として、0.001～50mg/mlである。例えば、フェニルアラニンでは好ましくは0.1～25mg/ml、さらに好ましくは1～20mg/mlであり、アルギニンでは好ましくは0.1～25mg/ml、さらに好ましくは1～20mg/mlであり、メチオニンでは好ましくは0.001～5mg/ml、さらに好ましくは0.01～4mg/mlである。

本発明の製剤には等張化剤として、ポリエチレングリコール；デキストラン、マンニトール、ソルビトール、イノシトール、グルコース、フラクトース、ラクトース、キシロース、マンノース、マルトース、シュクロース、ラフィノースなどの糖類を用いることができる。マンニトールが特に好ましい。マンニトールの添加量は製剤中に1～100mg/ml、さらに好ましくは5～60mg/mlである。

本発明の製剤には界面活性剤をさらに含むことができる。界面活性剤としては、非イオン界面活性剤、例えばソルビタンモノカプリレート、ソルビタンモノラウレート、ソルビタンモノバルミテート等のソルビタン脂肪酸エステル；グリセリンモノカプリレート、グリセリンモノミリテート、グリセリンモノステアレート等のグリセリン脂肪酸エステル；デカグリセリンモノステアレート、デカグリセ

- リルジステアレート、デカグリセリルモノリノレート等のポリグリセリン脂肪酸エステル；ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート、ポリオキシエチレンソルビタンモノステアレート、ポリオキシエチレンソルビタンモノパルミテート、ポリオキシエチレンソルビタ
- 5 ントリオレエート、ポリオキシエチレンソルビタントリステアレート等のポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル；ポリオキシエチレンソルビットテトラステアレート、ポリオキシエチレンソルビットテトラオレエート等のポリオキシエチレンソルビット脂肪酸エステル；ポリオキシエチレングリセリルモノステアレート等のポリオキシエチレングリセリン脂肪酸エステル；ポリエチレングリコ
- 10 ールジステアレート等のポリエチレングリコール脂肪酸エステル；ポリオキシエチレンラウリルエーテル等のポリオキシエチレンアルキルエーテル；ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコールエーテル、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンプロピルエーテル、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンセチルエーテル等のポリオキシエチレンポリオキシプロピレンアルキルエーテル；
- 15 ポリオキシエチエレンノニルフェニルエーテル等のポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル；ポリオキシエチレンヒマシ油、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油（ポリオキシエチレン水素ヒマシ油）等のポリオキシエチレン硬化ヒマシ油；ポリオキシエチレンソルビットミツロウ等のポリオキシエチレンミツロウ誘導体；ポリオキシエチレンラノリン等のポリオキシエチレンラノリン誘導体；ポリ
- 20 オキシエチレンステアリン酸アミド等のポリオキシエチレン脂肪酸アミド等のHLB 6～18を有するもの；陰イオン界面活性剤、例えばセチル硫酸ナトリウム、ラウリル硫酸ナトリウム、オレイル硫酸ナトリウム等の炭素原子数10～18のアルキル基を有するアルキル硫酸塩；ポリオキシエチレンラウリル硫酸ナトリウム等の、エチレンオキシドの平均付加モル数が2～4でアルキル基の炭素原子数
- 25 が10～18であるポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸塩；ラウリルスルホコハク酸エステルナトリウム等の、アルキル基の炭素原子数が8～18のアルキルスルホコハク酸エステル塩；天然系の界面活性剤、例えばレシチン、グリセロリン脂質；スフィンゴミエリン等のフィンゴリン脂質；炭素原子数12～18の脂肪酸のシヨ糖脂肪酸エステル等を典型的例として挙げることができる。本発

明の製剤には、これらの界面活性剤の1種または2種以上を組み合わせる添加することができる。

好ましい界面活性剤はポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステルであり、特に好ましいのはポリソルベート20、21、40、60、65、80、81、

5 85であり、最も好ましいのはポリソルベート20及び80である。

本発明のG-C-S-F含有製剤に添加する界面活性剤の添加量は、一般にはG-C-S-F 1重量部に対して0.0001~10重量部であり、好ましくはG-C-S-F 1重量部に対して0.01~5重量部であり、最も好ましくはG-C-S-F 1重量部に対して0.2~2重量部である。

10 本発明のG-C-S-F製剤のpHは好ましくは5~7であり、さらに好ましくはpHが5.5~6.8であり、さらに好ましくはpHが6~6.7であり、最も好ましくはpHが6.5である。

本発明のG-C-S-F製剤には、所望によりさらに希釈剤、溶解補助剤、賦形剤、pH調整剤、無痛化剤、緩衝剤、含硫還元剤、酸化防止剤等を含むてもよい。

15 例えば、含硫還元剤としては、N-アセチルシステイン、N-アセチルホモシステイン、チオクト酸、チオジグリコール、チオエタノールアミン、チオグリセロール、チオソルビトール、チオグリコール酸及びその塩、チオ硫酸ナトリウム、グルタチオン、並びに炭素原子数1~7のチオアルカン酸等のスルフヒドリル基を有するもの等が挙げられる。また、酸化防止剤としては、エリソルビン酸、ジ
20 ブチルヒドロキシトルエン、ブチルヒドロキシアニソール、 α -トコフェロール、酢酸トコフェロール、L-アスコルビン酸及びその塩、L-アスコルビン酸パルミテート、L-アスコルビン酸ステアレート、亜硫酸水素ナトリウム、亜硫酸ナトリウム、没食子酸トリアミル、没食子酸プロピルあるいはエチレンジアミン四
25 酢酸二ナトリウム(EDTA)、ピロリン酸ナトリウム、メタリン酸ナトリウム等のキレート剤が挙げられる。さらには、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、リン酸ナトリウム、リン酸カリウム、炭酸水素ナトリウムなどの無機塩；クエン酸ナトリウム、クエン酸カリウム、酢酸ナトリウムなどの有機塩などの通常添加される成分を含んでいてよい。

本発明のG-C-S-F製剤は溶液製剤、凍結乾燥製剤、噴霧乾燥製剤などを含む。

最も好ましくは凍結乾燥製剤である。

- 本発明の製剤は、これらの成分をリン酸緩衝液（好ましくはリン酸一水素ナトリウム－リン酸二水素ナトリウム系）及び／又はクエン酸緩衝液（好ましくはクエン酸ナトリウムの緩衝液）などの溶液製剤の分野で公知の水性緩衝液に溶解することによって溶液製剤を調製し、あるいはこのようにして調製された溶液製剤を定法により凍結乾燥、又は噴霧乾燥することによって製造できる。

本発明の安定化されたG-C S F含有製剤は通常非経口投与経路で、例えば注射剤（皮下注、静注、筋注など）、経皮、経粘膜、経鼻、経肺などで投与されるが、経口投与も可能である。

- 10 本発明のG-C S F製剤は、通常密封、滅菌されたプラスチックまたはガラス容器中に収納されており、使用時に純水（注射用滅菌水）に溶解して使用する。

- 本発明の製剤中に含まれるG-C S Fの量は、治療すべき疾患の種類、疾患の重症度、患者の年齢などに応じて決定できるが、一般には最終投与濃度で1～1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは10～800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、さらに好ましくは50
15 ～500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ である。

本発明の製剤は、感染症や癌の化学治療において、抗生物質、抗菌剤、抗癌剤などの薬剤を投与する際に同時投与すると、患者の抵抗力、活性などといった免疫応答力に基づいた防御機能を改善することが判明しており、臨床上極めて有用である。従って、本発明の製剤はこれらの薬剤と併用投与することができる。

- 20 本発明のG-C S F製剤は後述の実施例に示すように、25℃－3ヶ月長期保存試験又は40℃－2ヶ月長期保存試験を行った後にも、あるいは50℃－1ヶ月間の加速試験又は60℃－2週間の加速試験を行った後にも、極めて良好なG-C S F残存率を示す。また、50℃－1ヶ月間の加速試験後又は60℃－2週間の加速試験を行った後にも、G-C S Fのメチオニン残基酸化体生成率がほとんど観察されなかった。本発明のG-C S F製剤は25℃－3ヶ月長期保存試験
25 後におけるG-C S F残存率が90%以上、好ましくは95%以上であるか、40℃－2ヶ月長期保存試験後におけるG-C S F残存率が90%以上、好ましくは95%以上であるか、50℃－1ヶ月間の加速試験後におけるG-C S F残存率が90%以上、好ましくは95%以上であるか、60℃－2週間の加速試験後

におけるG-C S F残存率が90%以上、好ましくは95%以上であり、かつ50℃-1ヶ月間の加速試験後又は60℃-2週間の加速試験後におけるG-C S Fのメチオニン残基酸化体生成率が1%以下、好ましくは検出限界以下である。

- 本発明の製剤では、後述する実施例の結果から、リジン、ヒスチジン、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、トレオニン、アスパラギンから成る群より選ばれる一種以上のアミノ酸と、疎水性アミノ酸から選ばれる一種以上のアミノ酸を添加することにより特に常温における長期保存後のG-C S F残存率を増加することができ、またメチオニンを添加することにより、G-C S Fのメチオニン残基酸化体生成率を検出限界以下にすることが観察された。本発明者らは、
- 5 特定の理論に拘束されるつもりはないが、G-C S Fのメチオニン残基に代えて、添加されたメチオニンが酸化されることにより、G-C S Fのメチオニン残基酸化体生成率を低くすると推測した。
- 10

- さらに本発明によれば、特に、メチオニン残基の酸化体生成に、より影響を受けやすく、微量で生理活性を有する、メチオニン残基を有する生理活性タンパク質の組成物にメチオニンを添加することにより、該生理活性タンパク質のメチオニン残基の酸化体生成を防止することができる。特に、該生理活性タンパク質組成物中に、安定化剤として他のタンパク質を含まない場合、タンパク質組成物が凍結乾燥されている場合、あるいはタンパク質組成物が溶液状態の場合には、タンパク質のメチオニン残基酸化体が生成しやすいことから、メチオニンの添加は
- 15 有効であると考えらる。
- 20

さらに本発明の組成物に、その他の一種以上のアミノ酸を添加することにより、メチオニン残基の酸化体生成を抑制し、且つ、生理活性タンパク質の分解、凝集等を抑えた、安定化された、メチオニン残基を有する生理活性タンパク質含有組成物を製造することができる。

- 25 このとき添加するアミノ酸としては、リジン、ヒスチジン、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、フェニルアラニン、トリプトファン、ロイシン、イソロイシン、バリン、アラニン、プロリン、グリシン、セリン、トレオニン、アスパラギン、グルタミン、チロシン等が挙げられ、好ましくは、ヒスチジン、アルギニン、フェニルアラニンである。

本発明の生理活性タンパク質としては、例えば、

- サイトカイン；インターロイキン（IL-1～IL-13など）、コロニー刺激因子（顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、マクロファージコロニー刺激因子（M-CSF）、顆粒球／マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、
5 エリスロポエチン（EPO）等）、インターフェロン（IFN- α 、 β 、 γ 等）、腫瘍壊死因子（TNF- α 、TNF- β 等）、Transforming growth factor（TGF）、platelet-derived growth factor（PDGF）、LIF（leukemia inhibitory factor）、oncostatin M（OSM）、migration inhibitory factor（MIF）、ケモカイン、IL-8、LD78、MCP-1など、
10 生理活性ペプチド；インシュリン、グルカゴン、パラサイロイドホルモン（PTH）、ガストリン、セレクトイン、コレシストキニン、ガシトリック・インヒビトリ、ポリペプチド、サブスタンスP、モチリン、脾ポリペプチド、ニューロテンシン、エンテログルカゴン、ガストリン放出ペプチド、ソマトスタチン-28、ダイノルフィン、ガラニン、バロニン、パンクレオスタチン、ゼオブシンなど
15 生体酵素；メチオニン残基が活性中心に存在する酵素（例えば、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ等）など、

または、それらの変異体が挙げられる。

- 本発明の生理活性タンパク質としては、好ましくは、サイトカインまたは生理活性ペプチドであり、より好ましくは、G-CSF、エリスロポエチン等のコロ
20 ニー刺激因子またはPTHを示し、さらに好ましくは、G-CSF、エリスロポエチンまたはPTHを示す。

本発明を以下の実施例によってさらに詳しく説明するが、本発明の範囲はこれに限定されない。本発明の記載に基づき種々の変更、修飾が当業者には可能であり、これらの変更、修飾も本発明に含まれる。

25 実施例

試験方法

バイアルあたりの各原料の添加量が下記の表1及び表2となるように各調剤液を調製し、無菌濾過を行った後、無菌的に各バイアルに1mLずつ正確に充填し、凍結乾燥に供した。凍結乾燥終了後、完全打栓し、G-CSF凍結乾燥製剤を製

造した。

【表 1】

表 1

	G-CSF	フェニルアラニン	アルギニン	メチオニン	マンニトール	ポリソルベート20	pH緩衝剤
試料 1	250 μ g	10mg	10mg	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にて pH7.4
試料 2	250 μ g	10mg	10mg	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にて pH6.5
	G-CSF	フェニルアラニン	アルギニン	メチオニン	マンニトール	ポリソルベート20	pH緩衝剤
試料 3	100 μ g	0mg	0mg	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にて pH6.5
試料 4	100 μ g	10mg	0mg	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にて pH6.5
試料 5	100 μ g	0mg	10mg	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にて pH6.5
試料 6	100 μ g	10mg	10mg	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にて pH6.5
	G-CSF	フェニルアラニン	アルギニン	メチオニン	マンニトール	ポリソルベート20	pH緩衝剤
試料 7	250 μ g	0mg	0mg	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にて pH6.5
試料 8	250 μ g	10mg	0mg	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にて pH6.5
試料 9	250 μ g	0mg	10mg	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にて pH6.5
試料 10	250 μ g	10mg	10mg	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にて pH6.5

	G-CSF	アミノ酸 1	アミノ酸 2	メチオニン	マンニトール	ポリソルベート20	pH緩衝剤
試料 11	100 μ g	フェニルアラニン	リジン	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にて pH6.5
試料 12	100 μ g	フェニルアラニン	ヒスチジン	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にて pH6.5
試料 13	100 μ g	フェニルアラニン	アルギニン	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にて pH6.5
試料 14	100 μ g	フェニルアラニン	アスパラギン酸	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にて pH6.5
試料 15	100 μ g	フェニルアラニン	グルタミン酸	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にて pH6.5
試料 16	100 μ g	フェニルアラニン	セリン	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にて pH6.5
試料 17	100 μ g	フェニルアラニン	トレオニン	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にて pH6.5
試料 18	100 μ g	フェニルアラニン	チロシン	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にて pH6.5
試料 19	100 μ g	フェニルアラニン	アスパラギン	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にて pH6.5
試料 20	100 μ g	フェニルアラニン	グルタミン	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にて pH6.5

フェニルアラニンの添加量は、いずれも10mg (50mMに相当)
アミノ酸 2の添加量は、50mMに相当 (アミノ酸 1と等モル)

	G-CSF	アミノ酸 1	アミノ酸 2	メチオニン	マンニトール	ポリソルベート20	pH緩衝剤
試料 21	100 μ g	アルギニン	アラニン	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にて pH6.5
試料 22	100 μ g	アルギニン	バリン	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にて pH6.5
試料 23	100 μ g	アルギニン	ロイシン	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にて pH6.5
試料 24	100 μ g	アルギニン	イソロイシン	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にて pH6.5
試料 25	100 μ g	アルギニン	メチオニン	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にて pH6.5
試料 26	100 μ g	アルギニン	トリプトファン	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にて pH6.5
試料 27	100 μ g	アルギニン	フェニルアラニン	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にて pH6.5
試料 28	100 μ g	アルギニン	プロリン	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にて pH6.5
試料 29	100 μ g	アルギニン	グリシン	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にて pH6.5
試料 30	100 μ g	アルギニン	セリン	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にて pH6.5
試料 31	100 μ g	アルギニン	トレオニン	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にて pH6.5
試料 32	100 μ g	アルギニン	アスパラギン	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にて pH6.5
試料 33	100 μ g	アルギニン	グルタミン	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にて pH6.5

アルギニンの添加量は、いずれも10mg (50mMに相当)
アミノ酸 2の添加量は、50mMに相当 (アミノ酸 1と等モル)

【表 2】

	G-CSF	Phe	Arg	Met	Mannitol	Polysorbate20	pH緩衝剤
試料 34	100 μ g	10mg	10mg	0mg	25mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にて pH6.5
試料 35	100 μ g	10mg	10mg	0.1mg	25mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にて pH6.5
試料 36	100 μ g	10mg	10mg	1mg	25mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にて pH6.5

このように無菌的に調製したG-C S F含有凍結乾燥製剤を、60℃の恒温槽内で2週間及び1ヶ月；50℃の恒温槽内で1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月；40℃の恒温槽内で2ヶ月、4ヶ月、6ヶ月；並びに25℃の恒温槽内で3ヶ月、6ヶ月静置した。

- 5 加速品製剤、及び未加速品製剤は、1 mLの純水で正確に溶解し、下記の方法の試験試料とした。

バイアル中のG-C S F含有量（残存率）を下記の方法1に基づき測定した。
また、バイアル中のG-C S Fメチオニン残基酸化体生成率を下記の方法2に基づき測定した。

10 方法1

試料は、C4逆相カラム（4.6 mm x 250 mm、300 オングストローム）を用い、純水、アセトニトリル、トリフルオロ酢酸を移動相に用いた逆相系高速液体クロマトグラフィー法によりG-C S F含量を測定した。G-C S Fとして5 µg相当量を注入し、アセトニトリルのグラジエントによりG-C S Fを溶出させ、215 nmの波長で分光学的に検出した。

本方法で測定したG-C S F含量を用い、下記の式に基づき、60℃-2週間、及び50℃-1ヶ月間加速後及び60℃で2週間及び1ヶ月；50℃で1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月；40℃で2ヶ月、4ヶ月、6ヶ月；並びに25℃で3ヶ月、6ヶ月保存したときのG-C S F残存率を残存率（%）を算出した。

20 【式1】

$$\text{残存率 (\%)} = \frac{\text{(所定期間の加速後のG-C S F 含量)}}{\text{(未加速品のG-C S F 含量)}} \times 100$$

25 方法2

試料は、C4逆相カラム（4.6 mm x 250 mm、300 オングストローム）を用い、純水、アセトニトリル、トリフルオロ酢酸を移動相に用いた逆相系高速液体クロマトグラフィー法によりG-C S F未変化体及び、G-C S F Met 残基酸化体を測定した。アセトニトリルのグラジエントによりG-C S Fを溶出

させ、215 nmの波長で分光学的に検出した。

本方法で測定したG-CSF未変化体及びG-CSF Met残基酸化体にピーク面積を用い、下記の式に基づき、60℃-2週間、及び50℃-1ヶ月間加速後のG-CSF Met残基酸化体生成率(%)を算出した。

5 【式2】

$$\text{G-CSF Met 残基酸化体生成率(\%)} = \frac{(\text{G-CSF Met 残基酸化体})}{(\text{G-CSF 未変化体}) + (\text{未加速品の G-CSF 含量})} \times 100$$

10 実施例1：各種pHのG-CSF残存率に及ぼす効果

表1に記載の各種pHで調製した試料1及び試料2を、60℃-2週、及び50℃-1ヶ月間加速試験を行った後のG-CSF残存率を方法1に記載の式により算出した。得られた結果を表3に示す。

【表3】

15

	試料.1 pH 7.4	試料.2 pH 6.5
50℃-1ヶ月間	97.7	99.7
60℃-2週間	95.8	97.1

20 pH 7.4処方比べて、pH 6.5において、同等あるいはそれ以上の安定性を示した。

実施例2：各種アミノ酸のG-CSF残存率に及ぼす効果(1)

25 表1に記載の各種アミノ酸を添加して調製した試料3～6 (G-CSF含量100 μg)、並びに試料7～10 (G-CSF含量250 μg)を、60℃-2週間、及び50℃-1ヶ月間加速試験を行った後のG-CSF残存率を方法1に記載の式により算出した。得られた結果を表4及び表5に示す。

【表 4】

100 μ g G-CSF 含有製剤

	試料.3	試料.4	試料.5	試料.6
フェニルアラニン	無添加	10mg	無添加	10mg
アルギニン	無添加	無添加	10mg	10mg
50℃-1ヶ月間	72.9 %	84.8 %	82.4 %	98.3 %
60℃-2週間	67.2 %	77.9 %	68.8 %	95.0 %

【表 5】

250 μ g G-CSF 含有製剤

	試料.7	試料.8	試料.9	試料.10
フェニルアラニン	無添加	10mg	無添加	10mg
アルギニン	無添加	無添加	10mg	10mg
50℃-1ヶ月間	76.6 %	88.1 %	96.3 %	99.7 %
60℃-2週間	74.0 %	78.1 %	90.7 %	97.1 %

15 いずれのG-C S F含量においても、アミノ酸無添加処方比べて、フェニルアラニンを単独添加、あるいはアルギニンを単独添加した製剤では安定性が向上しているが、十分ではない。フェニルアラニンとアルギニンを併用することで安定性の顕著な向上が認められた。

20 実施例 3：各種アミノ酸のG-C S F残存率に及ぼす効果（2）

表 1 に記載の各種アミノ酸を添加して調製した試料 1 1 ～ 2 0（アミノ酸 1 としてフェニルアラニンを、アミノ酸 2 としてリジン、ヒスチジン、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、セリン、トレオニン、チロシン、アスパラギン及びグルタミンのいずれかを添加）、並びに試料 2 1 ～ 3 3（アミノ酸 1 としてアルギニンを、アミノ酸 2 としてアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、トリプトファン、フェニルアラニン、プロリン、グリシン、セリン、トレオニン、アスパラギン及びグルタミンのいずれかを添加）を、6 0℃-2 週間、及び 5 0℃-1 ヶ月間加速試験を行った後の G-C S F 残存率を方法 1 に記載の式により算出した。得られた結果を表 6 及び表 7 に示す。

【表 6】

	50℃-1ヶ月間	60℃-2週間
試料. 11	92.8%	91.2%
試料. 12	98.8%	97.5%
試料. 13	98.0%	96.0%
試料. 14	95.7%	96.7%
試料. 15	95.6%	94.0%
試料. 16	88.4%	87.8%
試料. 17	96.4%	90.7%
試料. 18	84.6%	81.7%
試料. 19	95.0%	95.3%
試料. 20	89.8%	87.2%

【表 7】

	50℃-1ヶ月間	60℃-2週間
試料. 21	89.0%	84.4%
試料. 22	88.9%	86.5%
試料. 23	96.3%	96.2%
試料. 24	88.5%	89.3%
試料. 25	95.5%	88.5%
試料. 26	101.4%	98.6%
試料. 27	97.0%	95.7%
試料. 28	89.4%	82.5%
試料. 29	90.9%	71.2%
試料. 30	89.2%	85.2%
試料. 31	90.6%	87.3%
試料. 32	94.0%	88.6%
試料. 33	90.1%	84.6%

フェニルアラニンとリジン、フェニルアラニンとヒスチジン、フェニルアラニンとアルギニン、フェニルアラニンとアスパラギン酸、フェニルアラニンとグルタミン酸、フェニルアラニンとトレオニン、フェニルアラニンとアスパラギンの組み合わせ、並びにアルギニンとロイシン、アルギニンとトリプトファン、アルギニンとフェニルアラニンの組み合わせにおいてそれぞれ顕著な長期保存安定性が観察された。

実施例 4：長期保存試験

フェニルアラニン 10mg、アルギニン 10mg、メチオニン 1mg を含み、G-C S F 含量が 100 μ g 及び 250 μ g の試料について、60℃で2週間及び1ヶ月；50℃で1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月；40℃で2ヶ月、4ヶ月、6ヶ月；並びに25℃で3ヶ月、6ヶ月保存したときの G-C S F 残存率を方法 1 に記載の式により算出した。得られた結果を表 8 に示す。

【表 8】

G-CSF (μ g)	60°C		50°C			40°C			25°C	
	2W ¹	1M ²	1M	2M	3M	2M	4M	6M	3M	6M
100	98.3	96.2	99.9	100.1	95.9	101.0	100.0	98.8	97.0	98.0
250	97.2	94.5	98.7	98.0	96.7	99.4	99.3	98.1	98.5	100.6

1: week

2: month

- 5 いずれも優れた G-C S F 残存率を示した。

実施例 5 : アミノ酸添加の G-C S F M e t 残基酸化体生成率に及ぼす効果

- 表 2 に記載の各量のメチオニンを添加して調製した試料 3 4 ~ 3 6 (フェニルアラニンとアルギニンの量は一定でメチオニン添加量がそれぞれ 0 m g , 0 . 1 m g , 1 m g) を、6 0 ° C - 2 週間加速試験を行った後に上記方法 2 で実施したクロマトグラムの 1 例を図 1 に、調製直後及び 5 0 ° C - 1 ヶ月加速試験を行った後に上記方法 2 で実施したクロマトグラムの 1 例を図 2 に示す。

- メチオニン無添加試料 (試料 3 4) では調製直後並びに 5 0 ° C - 1 ヶ月保存後のいずれにおいても G-C S F M e t 残基酸化体の生成が観察されたが、0 . 1 m g 以上のメチオニンの添加により、長期保存後にも G-C S F M e t 残基酸化体の生成を完全に抑制することができた。

また、G-C S F M e t 残基酸化体生成率を方法 2 に記載の式により算出した結果を表 9 に示す。

【表 9】

	試料.34 Met 0 mg	試料.35 Met 0.1 mg	試料.36 Met 1 mg
50°C-1 ヶ月間	1.2 %	N.D.	N.D.
60°C-2 週間	1.7 %	N.D.	N.D.

N.D. : 検出限界以下

- 20 このように、0 . 1 m g 以上のメチオニンの添加により、G-C S F M e t 残基酸化
25 体の生成を完全に抑制することができた。

実施例 6：パラサイロイドホルモン溶液製剤へのメチオニン添加による、メチオニン残基酸化抑制作用

1～84 残基を有するパラサイロイドホルモン（以下PTHと略記）（WO 90 01 44 15に記載の方法で製造）を200 μ g/mLを含み、バイアル当たりの各原料の添加量が下記の表10になるよう、試料37～試料39の各調剤液を調整し、無菌濾過を行った後、無菌的に各バイアルに1mLずつ正確に充填し、完全打栓し、PTH溶液製剤を製造した。

【表10】

試料	PTH	メチオニン	ポリソルベート-80	pH (リン酸/リン酸緩衝液)
試料37	200 μ g/mL	無添加	0.01%	6.5
試料38	200 μ g/mL	0.01%	0.01%	6.5
試料39	200 μ g/mL	0.1%	0.01%	6.5

10

このように無菌的に調整したPTH含有溶液製剤を、50℃の恒温槽内に3日間、静置した。

試料は、C18逆相カラム（4.6mm x 250mm、300オングストローム）を用い、純水、アセトニトリル、トリフルオロ酢酸を移動相に用いた逆相高速液体クロマトグラフィー法によりPTH含量を測定した。PTHとして、10 μ g相当量を注入し、アセトニトリルのグラジエントによりPTHを溶出させ、215nmの波長で分光学的に検出した。

本試験系では、PTH未変化体の直前に、図3に示したとおり、8番目のメチオニン残基が酸化されたPTH、18番目のメチオニン残基が酸化されたPTHが検出される。このクロマトグラムに示すとおり、PTH中の8番目のメチオニン残基における酸化、および、PTH中の18番目のメチオニン残基における酸化が、製剤中へのメチオニンの添加に伴い抑制可能であることが示されている。さらに、製剤中へのメチオニンの添加は、メチオニン残基以外の化学分解反応には影響を及ぼしてはいないこともわかる。すなわち、製剤中へのメチオニン添加により、他の化学分解反応には影響を与えず、タンパク質中のメチオニン残基酸

25

化体生成抑制のみを特異的に改善することが可能であることを示している。

産業上の利用分野

- 5 本発明のG-C S F製剤は、長期保存後においてもG-C S Fの残存率が極めて高く、またG-C S Fのメチオニン残基酸化体生成率をほぼ完全に抑制することのできる安定な製剤である。

請求の範囲

1. 25℃-3ヶ月長期保存試験後におけるG-C S F残存率が90%以上であるか、40℃-2ヶ月長期保存試験後におけるG-C S F残存率が90%以上であるか、50℃-1ヶ月間の加速試験後におけるG-C S F残存率が90%以上であるか、60℃-2週間の加速試験後におけるG-C S F残存率が90%以上であり、かつ50℃-1ヶ月間の加速試験後又は60℃-2週間の加速試験後におけるG-C S Fのメチオニン残基酸化体生成率が1%以下である、安定なG-C S F製剤。
- 5 2. リジン、ヒスチジン、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、トレオニン、アスパラギンから成る群より選ばれる一種以上のアミノ酸と、疎水性アミノ酸から選ばれる一種以上のアミノ酸、及びメチオニンを含む請求項1記載のG-C S F製剤。
3. 疎水性アミノ酸がフェニルアラニン、トリプトファン及びロイシンから選択される請求項2記載のG-C S F製剤。
- 15 4. リジン、ヒスチジン、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸から成る群より選ばれる一種以上のアミノ酸と、フェニルアラニン、トリプトファン及びロイシンから成る群より選ばれる一種以上のアミノ酸、及びメチオニンを含む請求項1記載のG-C S F製剤。
- 20 5. フェニルアラニン、アルギニン及びメチオニンを含む請求項1記載のG-C S F製剤。
6. 安定化剤として、実質的にタンパク質を含まない請求項1~5のいずれかに記載のG-C S F製剤。
7. 凍結乾燥製剤である請求項1~6のいずれかに記載のG-C S F製剤。
- 25 8. マンニトールをさらに含む請求項1~7のいずれかに記載のG-C S F製剤。
9. 界面活性剤をさらに含む請求項1~8のいずれかに記載のG-C S F製剤。
10. 界面活性剤がポリオキシエチレンソルビタンアルキルエステルである請求項9記載のG-C S F製剤。
11. 界面活性剤がポリソルベート20及び/又は80である請求項10記載の

G-C S F 製剤。

1 2. pHが5～7である請求項1～11のいずれかに記載のG-C S F 製剤。

1 3. pHが5.5～6.8である請求項12記載のG-C S F 製剤。

1 4. pHが6.5である請求項13記載のG-C S F 製剤。

5 1 5. G-C S FがCHO細胞から産生されたG-C S Fである請求項1～14のいずれかに記載のG-C S F 製剤。

1 6. リジン、ヒスチジン、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、トレオニン、アスパラギンから成る群より選ばれる一種以上のアミノ酸と、疎水性アミノ酸から選ばれる一種以上のアミノ酸を含み、pHが5～7であることを特徴とする、25℃-3ヶ月長期保存試験後におけるG-C S F残存率が90%以上であるか、40℃-2ヶ月長期保存試験後におけるG-C S F残存率が90%以上であるか、50℃-1ヶ月間の加速試験後におけるG-C S F残存率が90%以上であるか、60℃-2週間の加速試験後におけるG-C S F残存率が90%以上である、安定なG-C S F 製剤。

15 1 7. リジン、ヒスチジン、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸から成る群より選ばれる一種以上のアミノ酸と、フェニルアラニン、トリプトファン及びロイシンから成る群より選ばれる一種以上のアミノ酸を含み、pHが5～7であることを特徴とする、25℃-3ヶ月長期保存試験後におけるG-C S F残存率が90%以上であるか、40℃-2ヶ月長期保存試験後におけるG-C S F残存率が90%以上であるか、50℃-1ヶ月間の加速試験後におけるG-C S F残存率が90%以上であるか、60℃-2週間の加速試験後におけるG-C S F残存率が90%以上である、安定なG-C S F 製剤。

1 8. pHが6.5である請求項15又は16記載のG-C S F 製剤。

1 9. 実質的にメチオニン酸化体を生成しない、G-C S F安定化製剤。

25 2 0. メチオニンと他の一種以上のアミノ酸を含み、実質的にメチオニン酸化体を生成しない、G-C S F安定化製剤。

2 1. 安定化剤として、実質的にタンパク質を含まない請求項19又は20記載のG-C S F安定化製剤。

2 2. メチオニンを、メチオニン残基を有する生理活性タンパク質含有組成物に

添加することを特徴とする、該タンパク質のメチオニン残基酸化体生成の抑制方法。

23. 生理活性タンパク質が、サイトカインまたは生理活性ペプチドである請求項22記載の方法。

5 24. 生理活性タンパク質が、コロニー刺激因子またはPTHである請求項22記載の方法。

25. 生理活性タンパク質が、G-CSF、エリスロポエチンまたはPTHである請求項22記載の方法。

10 26. 安定化剤として他のタンパク質を含まないことを特徴とする請求項22～25のいずれかに記載の方法。

27. メチオニン残基を有する生理活性タンパク質含有組成物が、凍結乾燥されているかまたは溶液状態であることを特徴とする請求項22～26のいずれかに記載の方法。

15 28. メチオニンと他の一種以上のアミノ酸を含む、メチオニン残基を有する生理活性タンパク質含有安定化組成物。

29. アミノ酸が、リジン、ヒスチジン、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、フェニルアラニン、トリプトファン、ロイシン、イソロイシン、バリン、アラニン、プロリン、グリシン、セリン、トレオニン、アスパラギン、グルタミン及びチロシンから成る群より選ばれる1種または2種以上である請求項28記載の組成物。

20

30. 安定化剤として他のタンパク質を含まないことを特徴とする請求項28または29記載の組成物。

図 1

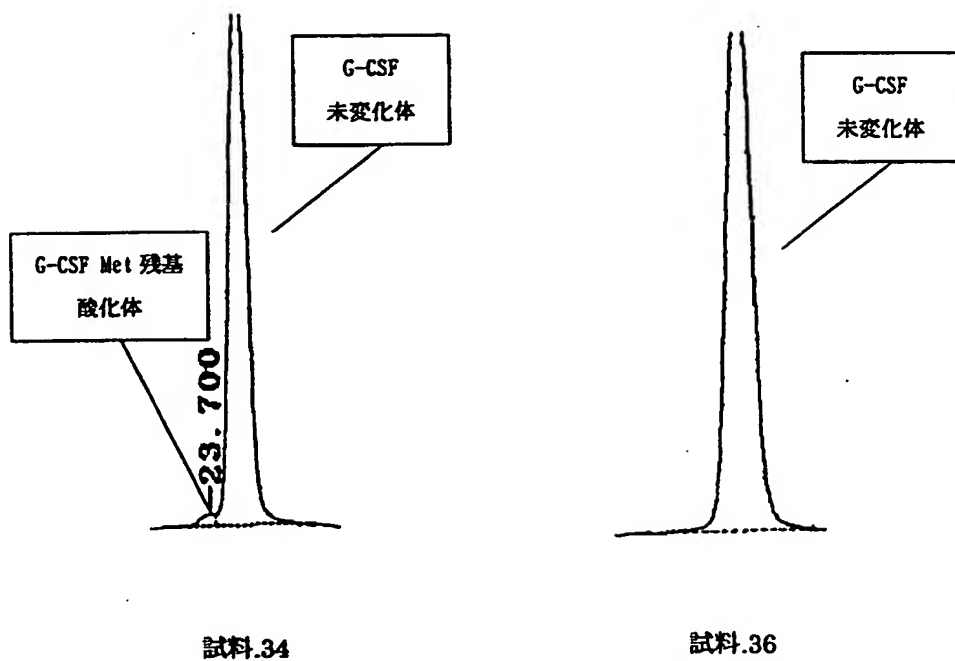


図 2

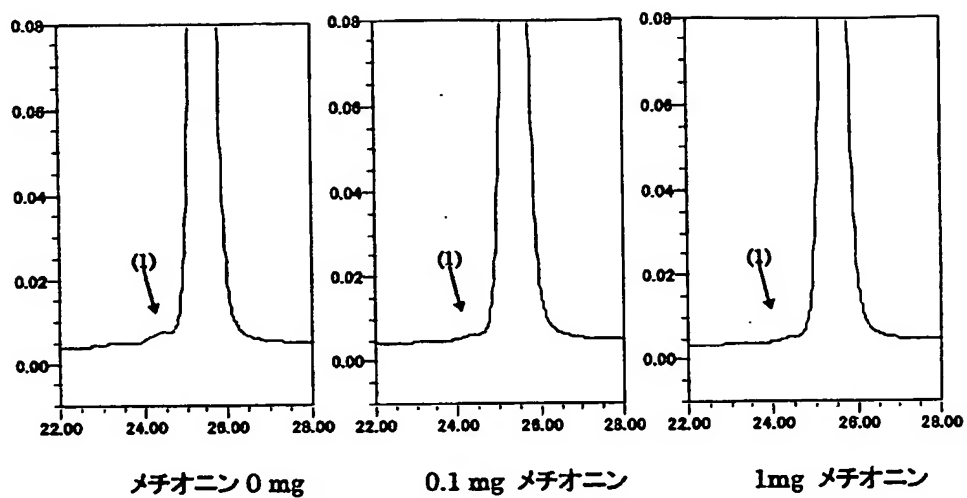
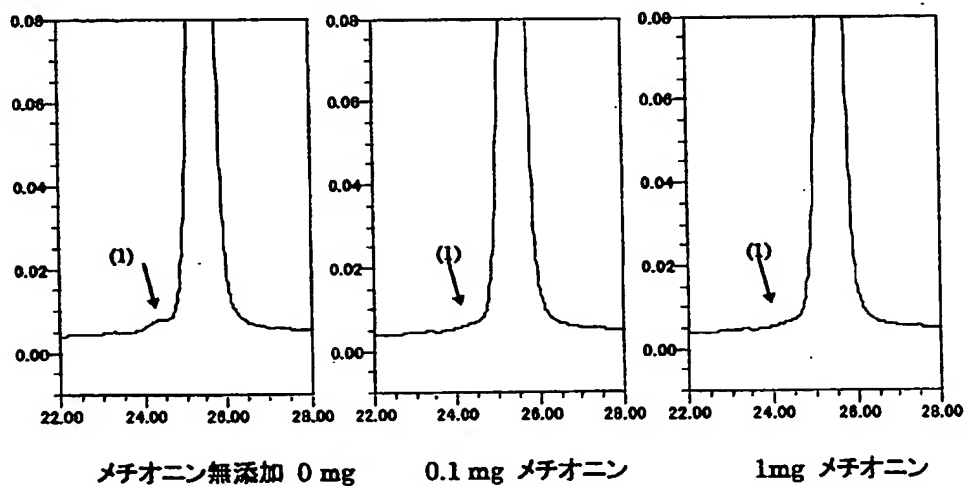
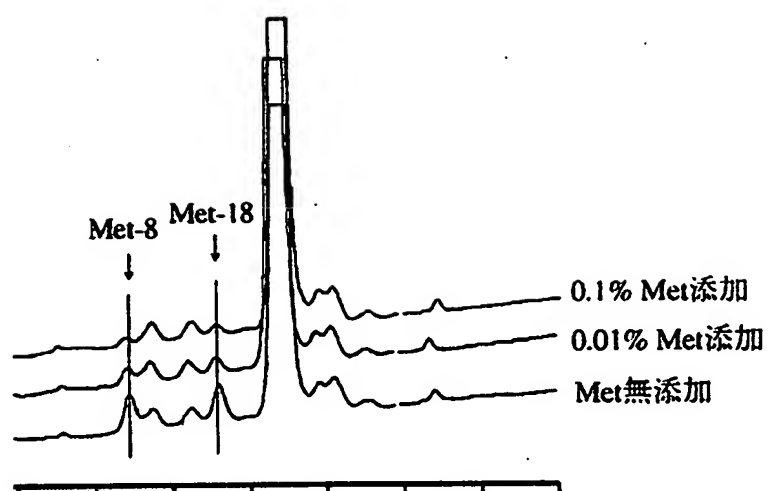
未加速品50°C-1ヶ月加速品

図 3



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/01160

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K38/19, 38/22, 38/29, 38/00, 47/16, 47/26, 47/14

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K38/19, 38/22, 38/29, 38/00, 47/16, 47/26, 47/14

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X - Y	WO, 92/15614, A1 (CHIRON OPHTHALMICS, INC.), 17 September, 1992 (17.09.92), page 5, line 26 to page 6, line 20; examples I-V, & US, 5272135, A	22, 23, 26, 27 1-21, 24, 25, 28-30
X - Y	US, 5358708, A (SCHERING CORPORATION), 25 October, 1994 (25.10.94), See Esp. examples 1-4, (Family: none)	22, 23, 26, 27 1-21, 24, 25, 28-30
X - Y	EP, 853945, A1 (AKZO NOBEL N. V.), 22 July, 1998 (22.07.98), See example 2 & JP, 10-203997, A & US, 5929028, A	22, 23, 26, 27 1-21, 24, 25, 28-30
X - Y	WO, 94/13143, A1 (APPLIED MICROBIOLOGY, INC.), 23 June, 1994 (23.06.94), page 1, lines 5 to 19; page 4, lines 30 to 31; Tables 7-9, & JP, 8-510716, A & EP, 673199, A1 & US, 5763375, A	22, 23, 26, 27 1-21, 24, 25, 28-30

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
07 April, 2000 (07.04.00)Date of mailing of the international search report
18.04.00Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/01160

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X - Y	JP, 5-331071, A (Asahi Chemical Industry Co., Ltd.), 14 December, 1993 (14.12.93), Claims; Par. Nos. 0009 to 0012; Tables 1,2,5, (Family: none)	22,23,26,27 1-21,24,25, 28-30
X - Y	JP, 3-287540, A (Teikoku Hormone Mfg. Co., Ltd.), 18 December, 1991 (18.12.91), Claims; Table 1(Sample 4), (Family: none)	22,23,26,27 1-21,24,25, 28-30
Y	WO, 94/14465, A1 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH), 07 July, 1994 (07.07.94), Cited in the application, page 6, line 8 to page 9, line 9; examples 3 to 14, & JP, 8-504784, A & EP, 674524, A1 & US, 5919443, A	1 - 30
Y	JP, 63-146829, A (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 18 June, 1988 (18.06.88), Claim 3; Table 1,2, (Family: none)	1 - 30
A	RIISOM, T., et al., 'Effect of amino acids on the autoxidation of safflower oil in emulsions' J. Am. Oil Chem. Soc., 1980, Vol. 57, No.10, p.354-359, Abstract; Table II, Figs. 1-6	1 - 30
A	US, 4915945, A (BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT), 10 April, 1990 (10.04.90), Column 2, line 39 to Column 3, line 6, & JP, 5-306236, A & EP, 101935, A1	1 - 30

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. A61K38/19, 38/22, 38/29, 38/00, 47/16, 47/26, 47/14

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. A61K38/19, 38/22, 38/29, 38/00, 47/16, 47/26, 47/14

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), WPIDS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X — Y	WO, 92/15614, A1 (CHIRON OPHTHALMICS, INC.), 17. 9月. 1992 (17. 09. 92), 第5頁第26行—第6頁第20行, 実施例 I—V 参照, & US, 5272135, A	22, 23, 26, 27 1-21, 24, 25, 28-30
X — Y	US, 5358708, A (SCHERING CORPORATION), 25. 10月. 1994 (25. 10. 94), 特に実施例 1-4 参照, ファミリーなし	22-24, 26, 27 1-21, 25, 28-30

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

07. 04. 00

国際調査報告の発送日

18.04.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JIP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

新留 豊



4C

9639

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X — Y	EP, 853945, A1 (AKZO NOBEL N. V.), 22. 7月. 1998 (22. 07. 98), 実施例2参照, & JP, 10-203997, A & US, 5929028, A	22, 23, 26, 27 1-21, 24, 25, 28-30
X — Y	WO, 94/13143, A1 (APPLIED MICROBIOLOGY, INC.), 23. 6月. 1994 (23. 06. 94), 第1頁第5-19行, 第4頁第30-31行, 表7-9参照, & JP, 8-510716, A, & EP, 673199, A1, & US, 5763375, A	22, 23, 26, 27 1-21, 24, 25, 28-30
X — Y	JP, 5-331071, A (旭化成工業株式会社), 14. 12月. 1993 (14. 12. 93), 特許請求の範囲, 段落0009-0012, 表1, 2, 5参照, ファミリーなし	22, 23, 26, 27 1-21, 24, 25, 28-30
X — Y	JP, 3-287540, A (帝国臓器製薬株式会社), 18. 12月. 1991 (18. 12. 91), 特許請求の範囲, 表1 (サンプル4) 参照, ファミリーなし	22, 23, 26, 27 1-21, 24, 25, 28-30
Y	WO, 94/14465, A1 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH), 7. 7月. 1994 (07. 07. 94), 本願中に引用, 第6頁第8行-第9頁第9行, 実施例3-14参照, & JP, 8-504784, A, & EP, 674524, A1, & US, 5919443, A	1 - 30
Y	JP, 63-146829, A (中外製薬株式会社), 18. 6月. 1988 (18. 06. 88), 特許請求の範囲第3項, 第1, 2表参照, ファミリーなし	1 - 30
Y	RIISOM, T., et al., 'Effect of amino acids on the autoxidation of safflower oil in emulsions' J. Am. Oil Chem. Soc., 1980, Vol. 57, No. 10, p. 354-359, 要約, 表II, 図1-6参照	1 - 30
A	US, 4915945, A (BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT), 10. 4月. 1990 (10. 04. 90), 第2欄第39行-第3欄第6行参照, & JP, 5-306236, A & EP, 101935, A1	1 - 30